ความหลากหลายทางพันธุกรรมในรอบปี ของลูกปลาเก๋าดอกแดง *Epinephelus coioides* (Hamilton, 1822) ที่จับจากอำเภอกันตัง จังหวัดตรัง

ภาณุวัฒน์ ภูมิตินทรีย์

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวาริชศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา
มิถุนายน 2550
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ ภาณุวัฒน์ ภูมิตินทรีย์ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์

.....ประธาน

(ดร.วันศุกร์ เสนานาญ)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิภูษิต มัณฑะจิตร)

.....กรรมการ

(ดร.วงศ์ปฐม กมลรัตน์)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน

(ดร.วันศุกร์ เสนานาญ)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิภูษิต มัณฑะจิตร)

.....กรรมการ

(ดร.วงศ์ปฐม กมลรัตน์)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุดารัตน์ สวนจิตร)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประทุม ม่วงมี)

วันที่ 15 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2550

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา จากเมธีวิจัยอาวุโส สำนักงานกองทุน
สนับสนุนการวิจัย (ศาตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร) ปี พ.ศ. 2546,
ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ ระดับบัณฑิตศึกษา จากบัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำภาคฤดูร้อน ปีการศึกษา 2548
และทุนอุดหนุนการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์ ปีการศึกษา 2549

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ประกาศคุณูปการ

ขอขอบคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.วันศุกร์ เสนานาญ คณะกรรมการ รองศาสตราจารย์ ดร.วิภูษิต มัณฑะจิตร และดร.วงศ์ปฐม กมลรัตน์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร กรรมการจากบัณฑิต ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุดารัตน์ สวนจิตร และขอบคุณ ดร.วรวุฒิ เกิดปราง ที่ช่วยในการเก็บตัวอย่างลูกปลาเก๋า

ขอบคุณ Dr. Somkiat Khokiattiwong, Dr. Duane E. Stevenson, Dr. John R. Gold, Dr. Luciana Sola, Dr. Michael S. Johnson, Dr. Paul Bentzen, Dr. Sabina De Innocentiis, Dr. Rachel J. Pears, Dr. N. K. Jue, Dr. Malia Ana J. Rivera, Dr. Edward J. Heist, Dr. Chaplin J. A., Dr. Patrice Francour, Dr. Robert W. Chapman, Dr. Gen Hua Yue, Dr. Jayasankar P., Dr. Amy O. Ball, Dr. Macro Arculeo และ Dr. Gavin Begg ที่ช่วยอนุเคราะห์เอกสารทางวิชาการ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนจากเมธีวิจัยอาวุโส สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (ศาตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร) ปี พ.ศ. 2546 และทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ ปี พ.ศ. 2549 จึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ภาณุวัฒน์ ภูมิตินทรีย์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

45911756: สาขาวิชา: วาริชศาสตร์; วท.ม. (วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต)
คำสำคัญ: ปลาเก๋าดอกแดง/ ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ภาณุวัฒน์ ภูมิตินทรีย์: ความหลากหลายทางพันธุกรรมในรอบปี ของลูกปลาเก๋าดอกแดง *Epinephelus coioides* (Hamilton, 1822) ที่จับจากอำเภอกันตัง จังหวัดตรัง (TEMPORAL GENETIC VARIATION OF JUVENILE ORANGE-SPOTTED GROUPER *EPINEPHELUS COIOIDES* (HAMILTON, 1822) COMMERCIALLY COLLECTED FROM KANGTANG DISTRICT, TRANG) อาจารย์ควบคุมวิทยานิพนธ์: วันศุกร์ เสนานาญ, Ph.D., วิภูษิต มัณฑะจิตร, Ph.D., วงศ์ปฐม กมลรัตน์, Ph.D. 82 หน้า. ปี พ.ศ. 2550.

ในแหล่งประมงหนึ่ง ๆ ลูกปลาเก๋าดอกแดง (*Epinephelus coioides*) มักมีการจับได้จากธรรมชาติตลอดทั้งปี ซึ่งกลุ่มลูกปลานี้อาจมาจากพ่อแม่พันธุ์กลุ่มเดียว หรือหลายกลุ่ม วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้คือ วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงความหลากหลายทางพันธุกรรมในรอบปีของกลุ่มลูกปลาเก๋าดอกแดงที่รวบรวมจากบริเวณอำเภอกันตัง จังหวัดตรัง ซึ่งเป็นแหล่งอนุบาลสัตว์น้ำที่สำคัญของประเทศ และเปรียบเทียบความแตกต่างพันธุกรรมของตัวอย่างที่เก็บต่างช่วงเวลากับความแตกต่างพันธุกรรมเชิงพื้นที่ กับตัวอย่างจากอำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี โดยวิเคราะห์ตัวอย่างลูกปลาขนาดเล็ก (6.5-10.3 เซนติเมตร) หรือ ขนาดกลาง (9.0-15.0 เซนติเมตร) และขนาดใหญ่ (17.5-29.0 เซนติเมตร) ในเดือนมกราคม เมษายน กรกฎาคม และพฤศจิกายน พ.ศ. 2547 จากจังหวัดตรัง และลูกปลาจากจังหวัดจันทบุรี (6.6-12.8 เซนติเมตร) ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่ง (CA2, CA6, CA7, EM07, EM08 และ EM10)

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทุกตำแหน่ง แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งอยู่ในช่วง 5-23 อัลลิล ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้จากการสังเกตอยู่ในช่วง 0.512-0.629 ความถี่จีโนไทป์ของไมโครแซทเทลไลท์เกือบทุกตำแหน่งของลูกปลาทุกกลุ่มตัวอย่าง เป็นไปตามสัดส่วนที่คาดหวังในสภาวะสมดุลตามทฤษฎีฮาร์ดี้-ไวน์เบิร์ก ยกเว้นที่ตำแหน่ง EM10 (7 กลุ่มตัวอย่างจาก 9 กลุ่มตัวอย่างที่รวบรวมจากจังหวัดตรัง) ที่มีค่าเฮทเทอไซโกซิตี้สูงกว่าค่าคาดหวังภายใต้สมดุลฮาร์ดี้-ไวน์เบิร์ก ($p<0.00092$) เมื่อจัดกลุ่มทางพันธุกรรมตามความคล้ายคลึงของลูกปลาตามขนาด เดือน และสถานที่รวบรวมตัวอย่าง พบว่า (1) ลูกปลาจากจังหวัดจันทบุรีแตกต่างทางพันธุกรรมจากลูกปลาที่รวบรวมจากจังหวัดตรัง และ (2) ลูกปลาทั้งขนาดกลาง และใหญ่ ที่รวบรวมได้ในเดือนกรกฎาคมมีแนวโน้มแตกต่าง

ทางพันธุกรรมจากลูกปลาเดือนอื่น ๆ ในรอบปี ที่รวบรวมจากจังหวัดตรัง ความแตกต่างในรอบปีที่พบอาจแสดงว่าลูกปลาเก๋าที่รวบรวมจากจังหวัดตรัง มาพ่อแม่พันธุ์มากกว่า 1 ประชากรย่อย ที่มีช่วงการสืบพันธุ์วางไข่ต่างกัน หรือ ที่อาศัยต่างบริเวณ แต่กระแสน้ำ พัดพาให้ลูกปลามารวมกัน ข้อมูลนี้อาจใช้เป็นพื้นฐานสำหรับการแยกจัดการประมงของลูกปลาสองกลุ่มที่มีความต่างทางพันธุกรรม นอกจากนั้นค่าที่ค่อนข้างต่ำของ Effective Population Size (Ne) ที่ประเมินจากข้อมูล Linkage Disequilibrium ของลูกปลาเก๋าที่จังหวัดตรัง (Ne=101, 95% CI=64-199 และ 240, 95% CI = 183-332 ในกลุ่มปลาเดือนกรกฎาคม และเดือนอื่น ๆ ตามลำดับ) อาจแสดงถึงความเสี่ยงต่อการลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาเก๋าดอกแดงประชากรนี้ ข้อมูลลักษณะนี้ สามารถใช้ร่วมกับข้อมูลชีววิทยาของประชากรเพื่อให้การจัดการประชากรปลาเก๋ายั่งยืนมากขึ้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

45911756: MAJOR: AQUATIC SCIENCE; M.Sc. (AQUATIC SCIENCE)
KEYWORDS: ORANGE-SPOTTED GROUPER/ GENETIC VARIATION
PANUWAT PUMITINSEE: TEMPORAL GENETIC VARIATION OF JUVENILE ORANGE-SPOTTED GROUPER *EPINEPHELUS COIOIDES* (HAMILTON, 1822) COMMERCIALLY COLLECTED FROM KANGTANG DISTRICT, TRANG. THESIS ADVISORS: WANSUK SENANAN, Ph.D., VIPOOSIT MANTHAHCHITRA, Ph.D., WONGPATHOM KAMONRAT, Ph.D. 82 P. 2007.

In a fishing ground, juveniles of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) are consistently exploited year round. A question pertaining to fisheries management is whether the fingerlings collected at different time in a year come from one reproductively isolated population. The objectives of this study were to analyze temporal genetic diversity of juvenile samples collected from Kangtang district, Trang, an important nursery ground for marine organisms, and to compare the level of temporal differentiation with spatial genetic differentiation. I analyzed two size groups of juveniles from Trang: small (6.5-10.3 cm) or medium (9.0-15.0 cm) and large (17.5-29.0 cm), collected in January, April, July and November 2004 and one size group from Chantaburi (6.6-12.8 cm), using six microsatellite genetic markers (CA2, CA6, CA7, EM07, EM08 and EM10).

All microsatellite markers revealed moderate genetic variation with the number of alleles per locus ranging from 5-23 and observed heterozygosity ranging from 0.512-0.629. Genotypic frequencies of most microsatellite loci across all groups did not deviate from those expected under the Hardy-Weinberg equilibrium, except for those at EM10 (7 sample out of 9 sample collected from Trang) which were mostly heterozygote excess ($p<0.00092$). Analyses of among-sample genetic differentiation (Sizes, Sampling Months and Sampling Locations) showed that (1) the Chantaburi sample was genetically distinct from the Trang samples, and (2) within the Trang samples, July samples were genetically different from samples obtained in other sampling months. This temporal genetic differentiation may suggest that juveniles inhabiting the Trang nursery area were derived from more than one genetically distinct spawner populations. This genetic

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

differentiation may be due to distinct spawning waves or the mixing of juvenile from spawners inhabiting different locations by sea currents. These data may be a basis for designing management strategies for harvesting genetically distinct subpopulations of juveniles. In addition, low effective population size (Ne), estimated from the linkage disequilibrium data for the Trang samples (Ne = 101, 95% CI = 64-199 and 240, 95% CI=183-332 for July samples and the remaining samples, respectively) may indicate the vulnerability to rapid loss of genetic variation of this population. Combination of the genetic and population biology data can aid a more sustainable management of grouper fishery.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... จ

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ช

สารบัญ..... ฌ

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญภาพ..... ฐ

บทที่

1 บทนำ..... 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

สมมติฐานของการวิจัย..... 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 3

ขอบเขตของการวิจัย..... 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

ชีววิทยาปลาเก๋า..... 4

การเปลี่ยนแปลงความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรสัตว์น้ำ..... 10

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม..... 11

ระดับโปรตีน..... 11

ไมโตคอนเดรีย ดีเอ็นเอ..... 12

ดีเอ็นเอในนิวเคลียส..... 13

ความแตกต่างทางพันธุกรรมในต่างช่วงเวลา..... 15

การประเมิน Effective Population Size..... 16

3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 21

การรวบรวมตัวอย่าง..... 21

วิธีการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ..... 22

การวิเคราะห์ข้อมูล..... 24

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัย	29
ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มตัวอย่าง	29
ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มตัวอย่าง และประเมินแนวโน้มการจัดกลุ่มตามความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม	30
5 อภิปรายและสรุปผล	44
แนวโน้มการจัดกลุ่มตามความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่าง	44
ข้อสันนิษฐานที่ 1	45
ข้อสันนิษฐานที่ 2	49
ความหลากหลายพันธุกรรมภายในตัวอย่าง	51
สมดุล Hardy-Weinberg	54
สรุปผลการวิจัย	55
ข้อเสนอแนะ	55
บรรณานุกรม	56
ภาคผนวก	70
ประวัติย่อของผู้วิจัย	79

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ขนาด และอายุของปลากลุ่ม *Epinephelus* และ *Cephalopholis* เมื่อสมบูรณ์เป็นเพศเมีย และเมื่อเปลี่ยนเป็นเพศผู้	8
2	ฤดูกาลสืบพันธุ์ ความสัมพันธ์ของช่วงเวลาการสืบพันธุ์กับข้างขึ้นข้างแรม (Lunar Cycle) และสัดส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย ของปลาเก๋าต่างชนิดและต่างประชากร	9
3	ความหลากหลายทางพันธุกรรมสัตว์ทะเลบางชนิดในประเทศไทย	18
4	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาสกุล *Epinephelus*	20
5	การรวบรวมตัวอย่างลูกปลาเก๋าจาก อ. กันตัง จ. ตรัง และ อ. ท่าใหม่ จ. จันทบุรี ระหว่างเดือนมกราคม-พฤศจิกายน ปี 2547	21
6	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ และ Annealing Temperature สำหรับพีซีอาร์ของไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่ง	23
7	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่ง ในกลุ่มตัวอย่างลูกปลาเก๋า *Epinephelus coioides* ที่รวบรวมภายใน 1 ปี ดัชนีแสดงความหลากหลาย ได้แก่ ขนาดของอัลลิล (R), Allelic Richness (AR), Percent Polymorphic Loci (P), จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง (A), ค่า Expected Heterozygosity (He), ค่า Observed Heterozygosity (Ho), ค่า P-Value แสดงความเบี่ยงเบนของความถี่จีโนไทป์จาก One-Tail Test ตามสัดส่วนที่คาดหวังภายใต้สมดุล Hardy-Weinberg (PHwe) Homozygote Excess และค่า Fixation Index (F_{IS})	32
8	ความถี่อัลลิลที่ไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่ง ของกลุ่มตัวอย่างลูกปลาจากจังหวัดตรัง 3 ขนาด (S, M และ L) ที่รวบรวมในเดือนมกราคม (JA), เมษายน (AP), กรกฎาคม (JU) และพฤศจิกายน (NO) และลูกปลาจากจังหวัดจันทบุรี (CH)	34
9	Genotypic Disequilibrium ที่ไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่ง	36
10	ค่า P ของการทดสอบ Genic และ Genotypic Differentiation ด้วย Exact Test ระหว่างคู่กลุ่มตัวอย่างที่เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 6 และ 5 ตำแหน่ง	37
11	ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง โดยใช้ข้อมูลเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่ง (A) และ 5 ตำแหน่ง (B)	39

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

12 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มตัวอย่าง (F_{ST}) ระหว่างคู่กลุ่มตัวอย่างที่เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่ง และ 5 ตำแหน่ง..... 40

13 สรุปแนวโน้มการจัดกลุ่มตัวอย่างภายในจังหวัดตรังตามความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมโดยวิธี Genic Differentiation, Genotypic Differentiation, F_{ST} pairwise (CI 95%>0), UPGMA จากค่าระยะห่างทางพันธุกรรม Cavalli-Sforza and Edwards Chord Distance (1967), Multidimension Scaling และ Principle Component Analysis โดยใช้ข้อมูลจากเครื่องหมาพันธุกรรม 6 ตำแหน่ง (CA2, CA6, CA7, EM07, EMO8 และ EM10) และ 5 ตำแหน่ง (CA2, CA6, CA7, EM07 และ EMO8)..... 43

14 การคาดคะเนช่วงเวลาในการสืบพันธุ์วางไข่ของพ่อแม่ปลาเก๋า การเพิ่มขึ้นของขนาด (เซนติเมตร) ของตัวอย่างลูกปลาเก๋า *E. coioides* ที่เก็บในรอบปี เทียบกับช่วงเวลาการสืบพันธุ์..... 48

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	บริเวณที่เก็บตัวอย่าง คลองเคี่ยม อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง	22
2	แผนผังแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมตามวิธี UPGMA จากค่าระยะห่างทางพันธุกรรม Cavalli-Sforza and Edward Chord Distance (1967) โดยใช้ข้อมูลเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่ง (A) และ 5 ตำแหน่ง (B).....	40
3	Multidimension scaling plot โดยใช้ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม Cavalli-Sforza and Edwards chord distance (1967) โดยใช้ข้อมูลเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่ง (A) และ 5 ตำแหน่ง (B) Stress Value แสดงค่าความเชื่อมั่นของข้อมูล.....	41
4	Principle component analysis plot ของตัวอย่างลูกปลาเก๋า แต่ละขนาดและแต่ละเดือน โดยใช้ข้อมูลเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (A) 6 ตำแหน่ง โดย % of Variance ที่อธิบายโดยแกนที่ 1 และ 2 เป็น 46.43% (p=0.001) และ 16.48% (p=0.955) ตามลำดับ และ (B) 5 ตำแหน่ง โดย % of Variance ที่อธิบายโดยแกนที่ 1 และ 2 เป็น 53.31% (p=0.001) และ 18.54% (p=0.860) ตามลำดับ.....	42
5	ทิศทางการไหลมวลน้ำผ่านช่องแคบมะละกา (ก) ช่วงฤดูลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ (พฤศจิกายนถึงเมษายน) (ข) ช่วงฤดูลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ (พฤษภาคมถึงตุลาคม).....	50
6	จีโนไทป์ของตัวอย่างลูกปลาเก๋าที่ตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ CA2 เทียบกับลำดับเบสของ pGEM-3Zf (+) Vector.....	78
7	จีโนไทป์ของตัวอย่างลูกปลาเก๋าที่ตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ CA6.....	79
8	จีโนไทป์ของตัวอย่างลูกปลาเก๋าที่ตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ CA7.....	79
9	จีโนไทป์ของตัวอย่างลูกปลาเก๋าที่ตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ EM07.....	80
10	จีโนไทป์ของตัวอย่างลูกปลาเก๋าที่ตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ EM08.....	80
11	จีโนไทป์ของตัวอย่างลูกปลาเก๋าที่ตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ EM10.....	81

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University